

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20224

研究課題名(和文) 最長寿国日本における老人性喉頭のリスク因子解明および治療に関する研究

研究課題名(英文) Investigation of clinical feature and treatment for presbylarynx in the most aged country, Japan

研究代表者

甲能 武幸 (Kono, Takeyuki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：90573410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は声帯の老化に伴う音声障害の臨床的特徴を把握し、病態解明と有効な治療法を探るための礎を築くことを目的としている。

老人性喉頭患者を対象とした臨床研究では、声帯粘膜の3次元構造解析で声帯中央遊離縁を中心とした声帯粘膜の萎縮を確認し、音声機能の特徴を明らかにした。しかし、本疾患に特異的なリスク因子は同定できなかった。さらに、声帯の老化を再現し、音声に関する実験を行う動物モデルとして、コモンマーモセットが有用か探るため、摘出喉頭の構造解析を行った。ヒトとの構造の類似から、この小型霊長類が声帯の老化を探る動物実験系に活用しうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to reveal clinical feature of presbyphonia, and set up the groundwork for investigation of pathogenesis and effective therapeutic modalities against presbylarynx.

Based on the clinical data of presbylarynx, the three dimensional structure analysis showed predominant atrophy in the free edge of mid vocal fold, and we clarified the characteristics of vocal function. However, we could not detect any specific risk factor.

Futhermore, we analyzed the laryngeal structure of Common Marmoset to evaluate whether it is useful for animal experiments on phonation calls for a thorough understanding of aging change. Due to the similarity of the histological structure with human being, this small primates might be adequate for establishment of aging model of larynx.

研究分野：喉頭科学

キーワード：老人性喉頭 声帯層構造 粘膜固有層 コモンマーモセット

## 1. 研究開始当初の背景

日本は世界一の高齢国であり、65歳以上の高齢者の割合は2020年には30%近くに及ぶと予測されている。声帯萎縮症や声帯溝症といった声帯の器質的な変化に伴う音声障害を認める老人性喉頭患者は年々増加傾向にある。社会活動を続け労働力の大きな担い手となる高齢者が増加している本邦で、本疾患はQOLの低下を引き起こし、社会活動性の低下にも繋がり社会的損失も大きい。しかし、老人性喉頭の知見は未だ世界的に乏しく、情報を発信すべき本邦からのevidenceも乏しい。また有効な治療法の確立もなされていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、まず老人性喉頭と健常高齢者の臨床データを比較することで、「通常の加齢」と「病的な加齢」を分ける背景因子を探索し、声帯構造の変化や音声機能の特徴を探る。さらに、老人性喉頭に対する有効な治療介入方法について検討する基礎実験のため、声帯の老化を再現する実験動物モデルの確立を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 臨床研究

音声障害を主訴に喉頭専門外来を受診した65歳以上の高齢者で声帯萎縮症あるいは声帯溝症の診断に至った132例を選定した。また、対照群として嚙声の自覚がない健常高齢者31例を選定した。

#### 老人性喉頭のリスク因子解析

上記両群間の臨床的患者背景(性別、BMI、体重変動の有無、各種血液データ、音声使用状況、喫煙・飲酒歴、併存疾患、服薬状況、家族歴など)を比較し、統計学的検討を行った。

#### 老人性喉頭の構造、音声機能解析

音声機能評価として、聴覚印象評価(GRBAS尺度)、喉頭内視鏡所見、ビデオストロボスコピー所見、音響分析(jitter%、shimmer%、NHR、F0など)、空気力学的検査(最長発声持続時間、平均呼気流量)、Voice Related Quality of Life (VRQOL)、Voice Handicap Index (VHI)、喉頭コンピームCTによる評価を行い、老人性喉頭と健常老人の比較、および声帯内注入術や音声治療などの現行治療前後の比較からその効果を評価した。

### (2) 基礎研究

当初ラットを用いた基礎実験系の確立を予定したが、ヒト声帯との声帯層構造の相違から臨床応用に支障をきたす可能性を考慮し、生物分類学上でよりヒトに近く、成長につれて音声に変化する性質があるとされる小型霊長類のコモンマーモセットに着目し、音声に関するin vivo動物モデルとして有用であるか探る為、その喉頭構造解析を行った。

#### 喉頭切片作成；

幼齢期・成体期・老齢期のコモンマーモセットの喉頭を剖出固定後、10%EDTA脱灰液に浸し脱灰処理し、喉頭組織の凍結切片(冠状断・水平断)を作成した。

#### 声帯層構造の観察；

Elastica van Gieson染色(EVG染色)にて、弾性線維と膠原線維、筋線維を染め、声帯の層構造を観察した。

#### 幹細胞マーカー免疫染色による組織幹細胞の探索；

切片をPBSにてリンスし、加熱したクエン酸バッファーで賦活化処理を行った。ブロッキングは10% normal goat serum in PBSを用いた。1次抗体として抗LGR5抗体(mouse IgG, Atlas Antibodies, HPA012530, 1:250)、Cytokeratin 8抗体(Rat IgG, DSHB, Troma, 1:10)、Cytokeratin 13抗体(Mouse IgG, Novus Biologicals, 2D7, 1:10)、Cytokeratin 14

抗体(Mouse IgG, Millipore, LL002, 1:50)をのせ一晚反応を行った。2次抗体は常温で遮光し反応を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 臨床実験

老人性喉頭の背景因子に関して、単変量解析で男性、呼吸器慢性疾患の既往、逆流性食道炎の既往で有意に有病率が高かったが、多変量解析ではそれぞれ独立したリスク因子とは認められなかった。

コンビームCTと立体内視鏡を活用した3次元的構造解析では、声帯中央の遊離縁の萎縮が最も顕著だった。老人性喉頭患者の音声は、健常老人と比較して有意にGRBAS尺度の各成分の値が高く、空気力学的・音響学的検査の各パラメーターも有意に不良であった。VHIやVRQOLなどの音声QOLは早期声門癌や喉頭乳頭腫などの声帯腫瘍術後の患者と同等で、健常老人と比較し有意に不良であった。声帯内アテロコラーゲン注入術やvocal function exerciseを中心とした音声治療による現行の介入は、いずれも声帯筋層の質的变化に伴う空気力学的パラメーターの改善は認めるが、音響改善の効果は乏しくVHIやVRQOLなどの音声QOLの改善もわずかであった。ゆえに、音響の改善を目的とした粘膜固有層の菲薄化に対する介入が必要と考えた。

##### (2) 基礎実験

###### 声帯層構造の観察

コモンマーモセットの喉頭はヒトと同様に喉頭室を有し、声帯は粘膜上皮・粘膜固有層・筋層の3層構造を呈し、粘膜固有層浅層は線維成分が比較的疎で、中間層は弾性線維が主体を成し、深層は膠原線維が主体で組織が密となっていた。(図1)

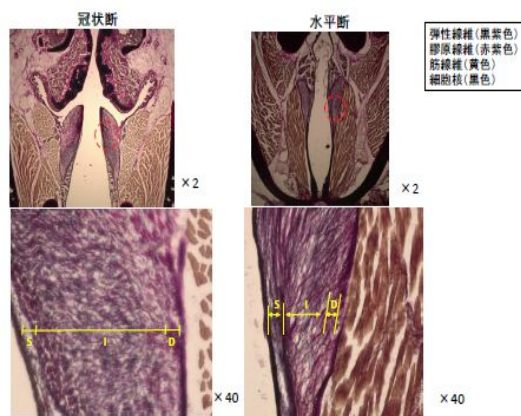


図1 成体コモンマーモセットの声帯層構造 (EVG染色)  
S, 粘膜固有層浅層; I, 粘膜固有層中間層; D, 粘膜固有層深層

一方、老齢期で膠原線維の密度が増加して弾性線維が減少していた。このように上皮直下から声帯筋に近づくにつれ硬くなる3次元構造を呈し、加齢により粘弾性が低下するのはヒト声帯と類似していると考えられた。

###### 喉頭領域の組織幹細胞の探索

仮声帯下面、喉頭室の陰～声帯上面、声門下にLGR5陽性細胞点在した。水平断では声門後壁に多く存在した。これらは主に粘膜上皮の最表層に発現が認められた。(図2)

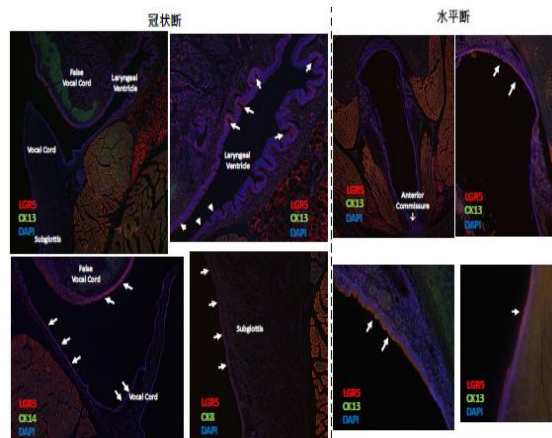


図2 成体コモンマーモセットの喉頭組織免疫染色

本検討に関しては、今後は自己複製能、多分化能の検証が課題である。

コモンマーモセットの喉頭はヒトと類似している可能性があり、吹鳴実験などの動的评价を含む基礎実験や喉頭の老化モデルの確立に活用しうるのでと考察される。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Takeyuki Kono, Koichiro Saito, Kosuke Uno, Kaoru Ogawa. Clinical trends and vocal function of presbylarynx; Status of the most advanced aging country, Japan. Combined Otolaryngology Spring Meeting: 2015
2. 甲能武幸, 細谷誠, 鈴木法臣, 藤岡正人, 小川郁. コモンマーモセットの声帯における組織幹細胞の同定: 第五回日本マーモセット研究会大会: 2016
3. Takeyuki Kono, Koichiro Saito, Kaoru Ogawa. Clinical trends and vocal function of presbylarynx; Status of the most advanced aging country, Japan. 16<sup>th</sup> Japan-Korea Joint Meeting of Otolaryngology Head and Neck Surgery: 2016
4. 甲能武幸, 富永健裕, 小川郁. 老人性喉頭に対する声帯内コラーゲン注入術の治療成果: 第 68 回日本気管食道科学会総会 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

甲能 武幸 (Takeyuki, Kono)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号: 90573410

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし